



República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0710179-1 A2**

(22) Data de Depósito: 29/03/2007  
(43) Data da Publicação: 09/08/2011  
(RPI 2118)



(51) *Int.Cl.:*  
A61K 31/4162 2006.01  
A61P 35/02 2006.01

(54) Título: **USO DE UM INIBIDOR DE QUINASE PARA O TRATAMENTO DE TUMORES RESISTENTES PARTICULARES**

(30) Prioridade Unionista: 30/03/2006 EP 06112023.4

(73) Titular(es): NERVIANO MEDICAL SCIENCES S.R.L.

(72) Inventor(es): Antonella Isacchi, Chiara Soncini, Daniele Fancelli, Jurgen Moll, Luisa Rusconi, Michele Modugno, Rosita Lupi

(74) Procurador(es): Veirano E Advogados Associados

(86) Pedido Internacional: PCT EP2007053041 de 29/03/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/113212 de 11/10/2007

(57) Resumo: USO DE UM INIBIDOR DE QUINASE PARA O TRATAMENTO DE TUMORES RESISTENTES PARTICULARES A presente invenção provê compostos de baixo peso molecular, nomeadamente, tetrahidropirrol [3, 4-c] pirazoles, mostrando alta afinidade para uma sítio ATP da tirosinoquinase ABL. Estes compostos são, por conseguinte, inibidores de tirosinoquinase competitivos ATP que também exibem uma potência inibidora significativa, e em particular, para o inibidor resistente aos mutantes de BCR- ABL da ABL T3151. Os compostos da invenção encontram aplicação no tratamento das doenças mediadas ABL inibidor resistente BCR-ABL, tal como leucemia mielógena crônica resistente a Imatinibe. Além disso, a invenção provê um método de rastreamento para a identificação de compostos capazes de ligar o sítio ATP de uma proteína de quinase, particularmente da quinase ABL do mutante T3151.

**USO DE UM INIBIDOR DE QUINASE PARA O TRATAMENTO DE  
TUMORES RESISTENTES PARTICULARES**

**CAMPO DA INVENÇÃO**

A presente invenção se relaciona ao tratamento de  
5 doenças mediadas pela ABL transformadas através do uso de  
pequenas moléculas inibidoras de quinase competitivas ATP.

**ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

A leucemia mielogenosa crônica (CML) é uma desordem  
hematológica que constitui cerca de 15% das leucemias em  
10 adultos, é definida pela expansão maligna da linhagem  
mielóide. O triunfo genético do CML é uma translocação  
recíproca entre os cromossomos 9 e 22 resultando no então  
chamado cromossomo Filadélfia (Ph). A consequência desta  
troca molecular inter-cromosômica é a criação do gene  
15 quimérico BCR-ABL, que codifica um polipeptídeo da  
tirosinoquinase onde o domínio da tirosinoquinase é  
consecutivamente ativado. A expressão desta proteína de  
fusão mostrou ser necessária e suficiente para o fenótipo  
transformado das células CML (FADERL, S, et. Al. The  
20 Biology of chronic myeloid leukemia. New England of  
Medicine. 1999, vol.341, no.3, p.164-172. SAWYERS, C.  
Chronic myeloid Leukemia. New England of Medicine. 1999,  
vol.340, no.17, p.1330-1340.) Além do CML, Atividade  
quinase ABL desregulada que é o resultado da translocação  
25 do cromossoma Ph é também detectada em até 20% dos paciente

adultos com leucemia linfoblástica (ALL) os pacientes (OTTMANN, O.G., et al. A phase 2 study of imatinib in patients with relapsed or refractory Philadelphia chromosome-positive acute lymphoid leukemias. Blood. 2002, 5 vol.100, no.6, p.1965-1971.)

Transduções do sinal ABL dos receptores de superfície celular do fator de crescimento e receptores de adesão regulam a estrutura citoesquelética. Várias proteínas de sinalização para interagir com ABL que ativa uma gama de 10 caminhos sinalizadores foram mostradas. Então, a inibição da ABL constitui uma nova aproximação para melhorar a terapia para os pacientes com CML.

A descoberta de que BCR-ABL é requerida para a patogênese da CML, e que a atividade da tirosinoquinase da 15 ABL é essencial para a transformação mediada por BCR-ABL, feita para a quinase ABL tem um alvo atraente para a intervenção terapêutica. Imatinibe (Gleevec®, também conhecido como STI571, EP 564409 A) é um inibidor ATP-competitivo de BCR-ABL que potencialmente inibe a atividade 20 da tirosinoquinase. A alta seletividade e eficácia da Imatinibe são devidas a sua habilidade em ligar e bloquear BCR-ABL em uma conformação cataliticamente ativa da enzima. Estudos clínicos e pré-clínicos demonstraram uma notável eficácia e alta tolerância de Imatinibe que é neste momento 25 o tratamento de primeira linha para todos os pacientes de

CML diagnosticados (DEININGER, M, et al. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. Blood. 2005, vol. 105, no.7, p.2640-2653.) Entretanto, a imatinibe é altamente efetiva na fase inicial da doença, considerando que os pacientes na fase acelerada e blástica da CML, bem como aqueles com Ph+ ALL, que freqüentemente desenvolvem resistência a imatinibe (DRUKER, B.J., et al. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tirosina kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. New England Journal of Medicine. 2001, vol.344, no.14, p.1038-1042. SAWYERS, C.L., et al. Imatinibe induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study. Blood. 2002, vol.99, no.10, p.3530-3539.)

Um mecanismo principal para a resistência a imatinibe é a evolução dos clones que adquirirem pontos de mutações dentro do domínio catalístico da tirosinoquinase BCR-ABL e diminuem ou evitam diretamente a interação com o inibidor.

Enquanto a maioria deles induz mudanças estruturais que previnem o domínio da quinase ABL para adotar a conformação inativa fechada requerida para a ligação da Imatinibe (SHAH, N.P., et al. Mechanisms of resistance to STI571 in Philadelphia chromosome-associated leukemias.

Oncogene. 2003, vol.22, no.47, p.7389-7395.), algumas mutações, como a Treonina 315 para substituição de Isoleucina (a seguir chamado T315I), interfere diretamente com a interação da Imatinibe ao Sítio de Ligação de ATP.

5 A compreensão da base molecular da resistência de Imatinibe estimulou a procura de novos inibidores de BCR-ABL que sejam eficazes contra doenças mediadas ABL resistentes a imitinib clinicamente observadas. Uma variedade de segunda geração do inibidor competitivo do ATP  
10 de BCR-ABL, como AMN 107 (WEISBERG, E, et al. Characterization of AMN 107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl. Cancer Cell. 2005, vol.7, p.129-141.) e BMS-354825 (também conhecido como Desatinibe) (SHAH, N.P., et al. Overriding imatinibe resistance with a  
15 novel ABL kinase inhibitor. Science. 2004, vol.305, no.5682, p.399-401.), foi desenvolvido e estudado sob prévias avaliações clínicas. Estes compostos são ativos contra a maioria dos mutantes ABL resistentes a Imatinibe, mas nenhum deles é ativo contra o mutante T315I que é a  
20 segunda mutação que ocorre com mais frequência em pacientes resistentes a Imatinibe (O'HARE, T, et al. In vitro activity of Bcr-Abl inhibitors AMN 107 and BMS-354825 against clinically relevant imatinibe-resistant AbI kinase domain mutants. Cancer Research. 2005, vol.65, no.11,  
25 p.4500-4505).

Pode ser concluído que é particularmente difícil inibir a mutação do ABL T315I com um composto competitivo ATP. De fato, até muito recentemente o único inibidor que foi relatado para também ser ativo contra o mutante T315I, 5 foi o ON12380 que realmente é um inibidor substrato competitivo (i.e. um ATP não competitivo) (GUMIREDDY, K., et al. A non-ATP- competitive inhibitor of BCR-ABL overrides imatinibe resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2005, vol.102, no.6, p.1992-1997.).

10 Recentemente, duas moléculas ATP-competitivas, VX-680 (HARRINGTON, E.A., et al. VX-680, a potent and selective small-molecule inhibitor of the Aurora kinases, suppresses tumor growth in vivo. Nature Medicine. 2004, vol. 10, no.3, p.262-267.) e BIRB-796 (PARGELLIS, C , et al. Inhibition of 15 p38 MAP kinase by utilizing a novel allosteric binding site. Nat. Struct. Biol.. 2002, vol.9, no.4, p.268-272.) foi relatado ser capaz de ligar in vitro ao T315I mutado do domínio da tirosinoquinase da ABL com baixa nanomolaridade Kd, mas mostrou uma baixa potência para inibição do T315I 20 em células BCR-ABL (CARTER, T.A., et al. Inhibition of drug-resistant mutants of ABL, KIT, and EGF receptor kinases.. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.. 2005, vol.102, no.31 , p.1 101 1- 11016).

No momento, não há nenhum tratamento efetivo visando 25 a quinase para pacientes afetados por doenças mediadas pela

ABL resistente ao inibidor BCR-ABL T315I, que seja calculado para constituir 20% de todos os pacientes que recaem após o tratamento de Imatinibe e é esperado que seja selecionado para o tratamento com as próximas gerações de inibidores mencionados acima. Isto representa uma necessidade médica para novos inibidores competitivos ATP potentes do mutante BCR-ABL T315I não disponíveis. A presente invenção focaliza este problema.

#### RESUMO DA INVENÇÃO

10 A invenção provê compostos de baixo peso molecular exibindo uma alta afinidade para o sítio ATP da tirosinoquinase ABL. Estes compostos são assim inibidores competitivos da tirosinoquinase ATP que exibem uma potência inibidora significativa para BCR-ABL T315I resistente ao inibidor mutantes da ABL, em particular para os mutantes ABL T315I resistentes a Imatinibe. A inibição da atividade da tirosinoquinase resulta no bloqueio da sinalização da cascata mediada por ABL e o mutante T315I.

Os compostos da presente invenção que mostram a atividade desejada são tetrahidropirrol[3,4-c]-pirazoles projetados para ser um alvo do sítio ATP das proteínas quinases. Os compostos desta classe química revelaram ser potentes inibidores competitivos da ATP da aurora quinase (FANCELLI, D., et al. Potent and selective Aurora inhibitors identified by the expansion of a novel scaffold

25

for protein kinase inhibition. Journal of Medicinal Chemistry. 2005, vol.48, no.8, p.3080-3084. PCT/WO 2005005427). Inesperadamente, os compostos com o mesmo suporte químico foram encontrados para exibir uma potência  
5 inibitória significativa para ABL e em particular eles podem também inibir in vitro a forma mutante T315I resistente ao inibidor BCR-ABL da ABL.

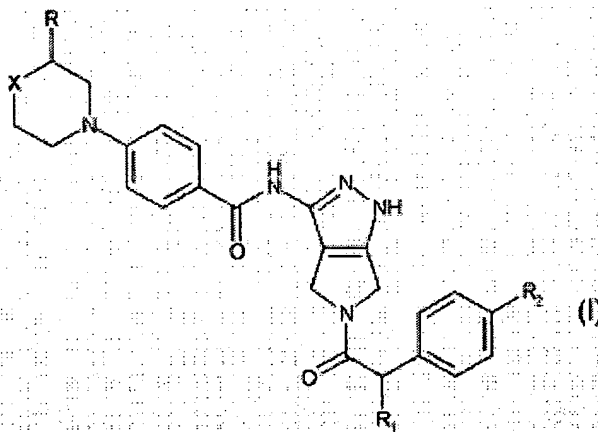
Devido à atividade biológica, os compostos da invenção oferecem um novo caminho para o desenvolvimento de  
10 um tratamento para a população de paciente que sofrem de doenças mediadas de ABL resistente a Imatinibe.

A invenção também provê um ensaio para a identificação de compostos adicionais que ligam o sítio ATP de uma proteína quinase alvo, em particular a  
15 tirosinoquinase ABL. Este ensaio mostra a habilidade para detectar o resultado da ligação ao sítio ATP alvo e é conduzido em condições quantitativas de modo que a afinidade de ligação de um composto para o sítio ATP pode ser determinada.

#### 20 DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Em um primeiro aspecto, a presente invenção se relaciona a um método para inibir uma atividade  
tirosinoquinase resistente ao inibidor BCR-ABL compreendendo contatar um polipeptídeo de tirosinoquinase  
25 resistente ao inibidor BCR-ABL com uma quantidade efetiva

do composto de fórmula (I).



em que R é hidrogênio ou metil,

5        R<sub>1</sub> é hidróxi ou um grupo alcóxi ou alquil C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> linear  
ou ramificado,

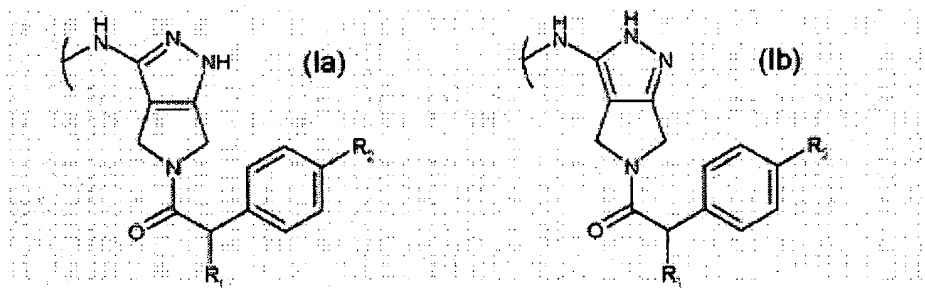
R<sub>2</sub> é um hidrogênio ou átomo de halogênio,

X é um grupo divalente selecionado de metileno  
(-CH<sub>2</sub>-) ou fluormetileno (-CHF-), ou um heteroátomo ou  
10 grupo heteroatômico selecionados de oxigênio (-O-) ou  
nitrogênio (-NR'-) onde R' é um átomo de hidrogênio, um  
grupo alquil C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> linear ou ramificado ou um grupo  
cicloalquil C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, ou um sal farmacêuticamente aceitável  
deste.

15        Os compostos de fórmula (I) da invenção têm átomos de  
carbono assimétricos e podem, portanto, existir como  
isômeros ópticos individuais, como misturas racêmicas ou  
como qualquer outra mistura que inclui uma maioria de um  
dos dois isômeros óptico que são pretendidos como dentro do  
20 escopo da presente invenção.

Em casos quando os compostos possam existir em formas tautoméricas, cada forma é contemplada como sendo incluído dentro desta invenção se existir em equilíbrio ou predominantemente em uma forma.

5 Como tal, a menos que seja informado, quando somente uma das formas tautoméricas seguintes da fórmula (Ia) ou (Ib) é indicada, o restante ainda é pretendido como incluído dentro do escopo da invenção:



10 Na presente descrição, a menos que especificado contrário, com o termo alquil C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> ou C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> linear ou ramificado, pretendemos qualquer dos grupos tais como, por exemplo, metil, etil, n-propil, isopropil, n-butil, isobutil, tert-butil e sec-butil.

15 Com o termo alquoxi C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> linear ou ramificado, pretendemos quaisquer dos grupos tais como, por exemplo, metóxi, etóxi, n-propoxi e isopropoxi.

Com o átomo de halogênio nós pretendemos um flúor, cloro, bromo ou átomo de iodo.

20 Com o termo cicloalquil C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, pretendemos qualquer grupo como ciclopropil, ciclobutil, ciclopentil e ciclohexil.

Claramente, dependendo da natureza do grupo X, este mesmo heterocíclico que é ligado à porção do fenileno dos compostos de fórmula (I) pode representar um piperidino, 4-fluoropiperidino, piperazino, 4-alkuil-piperazino, 4-cicloalquil-piperazino ou anel morfolino.

Os compostos da fórmula (I) são descritos e reivindicado no pedido de patente internacional WO2005/005427 e pode ser preparado de acordo com o processo aqui revelado.

10 O método da presente invenção pode ser executado in vitro ou in vivo. Um polipeptídeo de tirosinoquinase completo pode ser usado; alternativamente, uma porção do fragmento, ou análogo deste pode ser utilizado.

Mais particularmente, a atividade inibidora dos 15 compostos selecionados da invenção é determinada pelo ensaio gel-quinase. O ensaio consiste na transferência da radioatividade da porção do fosfato etiquetada pela quinase da ABL para um substrato, na presença do composto teste. Uma vez terminada a reação, a mistura de reação é carregada em um gel de poliacrilamida e sinal de radioatividade é 20 detectado. Este ensaio de inibição é melhor ilustrado nos exemplos.

Adicionalmente, a atividade inibidora do compostos selecionados da invenção é determinada em sistemas 25 celulares. As células satisfatórias são aquelas nas quais a

translocação cromosômica BCR-ABL ocorreu naturalmente, como células de leucemia humanas K-562 e células transfectadas com um recombinante construído levando o gene mutante ABL T315I. As células são tratadas com os compostos da invenção e atividade inibidora é detectada através de immunoblotting como ilustrado nos exemplos.

Em uma modalidade preferida da invenção, o polipeptídeo inibidor resistente a tirosinoquinase BCR-ABL é um mutante T315I da tirosinoquinase ABL.

Em uma modalidade mais preferida da invenção, o inibidor de BCR-ABL é Imatinibe.

Em um segundo aspecto, a presente invenção se relaciona a um método para tratar uma doença mediada ABL T315I resistente ao inibidor BCR-ABL que compreende administrar a um mamífero na necessidade de uma quantidade efetiva do composto de acordo com fórmula (I) como definido acima.

Dentro da extensão do método do tratamento reivindicado na presente invenção está o uso de todos os possíveis isômeros e suas misturas e de ambos os metabólitos e o bioprecursores farmacologicamente aceitáveis (de outro modo chamado de pró-droga) dos compostos de fórmula (I). Pró-drogas são quaisquer compostos covalentemente ligados, que liberam a droga ativa parente de acordo com fórmula (I), in vivo.

Os dois métodos acima são preferivelmente realizados com um composto da fórmula (I)

em que R é hidrogênio, R<sub>1</sub> é metóxi, R<sub>2</sub> é hidrogênio e X é metileno (-CH<sub>2</sub>-) ou é um heteroátomo ou grupo heteroatômico selecionados de oxigênio (-O-) ou nitrogênio (-NR-) em que R' é um átomo de hidrogênio, ou um grupo alquil selecionado de metil, etil, isopropil, ciclopropil ou tert-butil.

Mais preferivelmente, os compostos são selecionados do grupo que consiste de:

N-{5-[(2R)-2-metóxi-2-feniletanoil]-1,4,5,6-tetrahidro pirrol[3,4-c]pirazol-3-il}-4-(4-metilpiperazin-1-il) benzamida;

N-{5-[(2R)-2-metóxi-2-feniletanoil]-1,4,5,6-tetrahidro pirrol[3,4-c]pirazol-3-il}-4-(4-etilpiperazin-1-il) benzamida;

N-{5-[(2R)-2-metóxi-2-feniletanoil]-1,4,5,6-tetrahidro pirrol[3,4-c]pirazol-3-il}-4-(4-isopropilpiperazin-1-il) benzamida;

N-{5-[(2R)-2-metóxi-2-feniletanoil]-1,4,5,6-tetrahidro pirrol[3,4-c]pirazol-3-il}-4-(4-ciclopropilpiperazin-1-il) benzamida;

N-{5-[(2R)-2-metóxi-2-feniletanoil]-1,4,5,6-tetrahidro pirrol[3,4-c]pirazol-3-il}-4-piperidin-1-ilbenzamida;

4-(4-fluoropiperidin-1-il)-N-{5-[(2R)-2-metóxi-2-fenil etanoil]-1,4,5,6-tetrahidropirrol[3,4-c]pirazol-3-il} benzamida

5 N-{5-[(2R)-2-metóxi-2-feniletanoil]-1,4,5,6-tetrahidro pirrol[3,4-c]pirazol-3-il}-4-morfolin-4-ilbenzamida;

N-{5-[(2R)-2-metil-2-feniletanoil]-1,4,5,6-tetrahidro pirrol[3,4-c]pirazol-3-il}-4-(4-metilpiperazin-1-il) benzamida;

10 N-{5-[(2R)-2-metil-2-feniletanoil]-1,4,5,6-tetrahidro pirrol[3,4-c]pirazol-3-il}-4-(4-etilpiperazin-1-il) benzamida;

N-{5-[(2R)-2-fenilpropanoil]-1,4,5,6-tetrahidro pirrol[3,4-c]pirazol-3-il}-4-piperidin-1-ilbenzamida;

15 4-(4-fluoropiperidin-1-il)-N-{5-[(2R)-2-fenilpropanoil]-1,4,5,6-tetrahidropirrol[3,4-c]pirazol-3-il}benzamida;

4-morfolin-4-il-N-{5-[(2R)-2-fenilpropanoil]-1,4,5,6-tetrahidropirrol[3,4-c]pirazol-3-il}benzamida.

20 O composto mais preferido a ser usado nos dois métodos acima da invenção é N-5-[(2R)-2-metóxi-2-feniletanoil]-1,4,5,6-tetrahidropirrol[3,4-c]pirazol-3-il}-4-(4-metilpiperazin-1-il)benzamida, abaixo chamado de "Composto 1"

25 Os sais farmacêuticamente aceitáveis dos compostos de fórmula (I) inclui sais de adição de ácidos com ácidos

orgânicos ou inorgânicos como, por exemplo, nítrico, clorídrico, bromídrico, sulfúrico, perclórico, fosfórico, acético, trifluoracético, propiônico, glicólico, lático, oxálico, malônico, málico, malêico, tartárico, cítrico, 5 benzóico, cinâmico, mandélico, metanosulfônico, isetiônico e salicílico.

O termo "doenças mediadas ABL T315I" é pretendido por englobar doenças as quais inibem direta ou indiretamente a atividade da tirosinoquinase ABL T315I, é desejável.

10 O termo "inibidor de BCR-ABL" é pretendido por englobar moléculas competitiva ATP que têm a habilidade de inibir a atividade enzimática da proteína BCR-ABL. Exemplos não limitativos de tais moléculas são Imatinibe, Desatinibe e AMN107.

15 Em uma modalidade preferida do método descrito acima, a doença é uma leucemia resistente ao inibidor causada pelo mutante T315I da tirosinoquinase ABL.

Em uma modalidade mais preferida a leucemia é leucemia mielogenosa crônica.

20 Em outra modalidade preferida do método descrito acima, o inibidor da BCR-ABL é Imatinibe.

Um composto de acordo com fórmula (I) pode ser administrado a um sujeito sobre determinação do sujeito como tendo uma doença ou condição não desejada que se 25 beneficiariam através do tratamento com o dito composto. Os

médicos ou técnicos podem fazer a determinação como parte de uma diagnóstico de uma doença ou condição de um sujeito. O composto também pode ser usado na prevenção de tal condição que pode ser vista como redutora da probabilidade de um sujeito ter uma ou mais destas condições.

O método da invenção pode ser realizado contactando uma célula com um composto da fórmula (I) que inibe uma ou mais das atividades do mutante ABL T315I. Este método pode ser executado in vitro (por exemplo, cultivando a célula com o composto) ou, alternativamente, in vivo (por exemplo, administrando o composto a um sujeito). Também pode ser executado ex vivo, como no caso de células obtidas de um sujeito e tratada in vitro seguida pelo seu retorno ao sujeito.

In vivo, o efeito de uma proteína alvo inibindo a composição terapêutica pode ser avaliado em um modelo animal satisfatório.

Como usado aqui, uma quantidade efetiva de um composto se refere a uma quantidade suficiente para alcançar a proposta desejada. Determinação das quantidades efetivas está bem dentro da capacidade daqueles versados na arte baseados na obtenção de um efeito desejado. Uma quantidade efetiva dependerá dos fatores que incluem, mas que não se limitam, ao tamanho de um sujeito e/ou grau para o qual a doença ou condição não desejada progride no

sujeito. A quantidade efetiva também dependerá se o composto é administrado ao sujeito em uma única dosagem ou periodicamente com o passar do tempo.

O composto de fórmula (I) da presente invenção é planejado para o tratamento dos sujeitos. Como usado aqui, o termo "sujeito" é pretendido englobar mamíferos e não mamíferos. Exemplos de mamíferos incluem, mas não está limitado, a qualquer elemento da classe mamífera: humanos, primatas não humanos, tais como chimpanzés, e outros macacos e espécies de macaco; animais de fazenda, tais como gados, cavalos, ovelhas, cabras, suínos; animais domésticos tais como coelhos, cachorros e gatos; animais de laboratório incluindo roedores, tais como ratos, camundongos, porquinhos da índia, e semelhantes. Exemplos de não mamíferos incluem, mas não está limitado, pássaros, peixe e semelhantes.

O termo que "tratamento" como usado aqui inclui alcançar um benefício terapêutico.

Através do benefício terapêutico que dizer erradicação ou melhora da doença a ser tratada. Por exemplo, em um benefício terapêutico em um paciente com câncer, inclui erradicação ou melhora do câncer. Também, um benefício terapêutico é alcançado com a erradicação ou melhora de um ou mais dos sintomas fisiológicos associados com a desordem de modo que uma melhora é observada no

paciente, apesar do fato de que o paciente ainda possa estar afetado com a desordem.

O método da invenção inclui a administração de um composto da fórmula (I) como um único agente ou, 5 alternativamente, em combinação com uma ou mais de outras moléculas ou outros agentes satisfatórios para o tratamento de uma doença ou condições não desejadas como revelado aqui. Exemplos de moléculas ou agentes satisfatórios para o tratamento combinado são agentes citotóxicos ou 10 citoestáticos, agentes do tipo antibiótico, agentes alquilantes, agentes antimetabolitos, agentes hormonais, agentes imunológicos, agentes do tipo interferon, inibidores de ciclooxigenase (por exemplo, inibidores de COX-2), inibidores de matrixmetalloprotease, inibidores de 15 telomerase, inibidores de tirosinoquinase, agentes receptores do fator anticrescimento, agentes anti-HER, agentes anti-EGFR, agentes anti-angiogenesis (por exemplo, inibidores de angiogenesis), inibidores de transferase de farnesil, inibidores do caminho de transdução do sinal ras- 20 raf, inibidores do ciclo celular, outros inibidores cdk, agentes de ligação tubulina, inibidores de topoisomerase I, inibidores de topoisomerase II e semelhantes.

A presente invenção também inclui composições farmacêuticas que incluem um composto da fórmula (I) ou um 25 sal farmacêuticamente aceitável deste em associação com um

excipiente farmacêuticamente aceitável que pode ser portador ou um diluente.

As composições farmacêuticas que contêm os compostos da invenção são preparadas pelos seguintes métodos 5 convencionais e são administradas em uma forma farmacêutica satisfatória.

Por exemplo, as formas orais sólidas podem conter, junto com o composto ativo, diluente, por exemplo, lactose, dextrose, sacarose, sucrose, celulose, goma de milho ou 10 goma de batata; lubrificantes, por exemplo, sílica, talco, ácido de esteárico, esterato cálcio ou magnésio e/ou glicosídeos de polietileno ; agentes ligantes, por exemplo, gomas, goma arábica, gelatina, metilcelulose, carboximetilcelulose ou pirrolidona de polivinil; agentes 15 desintegradores, por exemplo, goma, ácido algínico, alginatos ou glicolato de goma de sódio; misturas efervescentes; corantes; adoçantes; agentes umidificantes tais como lecitina, polisorbatos, laurilsulfatos; e, em geral, substâncias inativas farmacologicamente e não 20 tóxicas usadas nas formulações farmacêuticas. Estas preparações farmacêuticas podem ser fabricadas de maneira conhecida, por exemplo, por meio de mistura, granulação, tabletagem, revestimentos de açúcar, ou processos de revestimento por filme.

25 As dispersões líquidas para administração oral podem

ser, por exemplo, xaropes, emulsões ou suspensões.

Como um exemplo, podem conter os xaropes, como portador, sacarose ou saccrose com glicerina e/ou manitol e sorbitol.

5 As suspensões e as emulsões podem conter, como exemplos de portadores, goma natural, ágar, alginate de sódio, pectina, metilcelulose, carboximetilcelulose ou álcool de polivinil.

A suspensão ou soluções para injeção intramuscular  
10 pode conter, junto com o composto ativo, um portador farmacologicamente aceitável, por exemplo, água estéril, azeite de oliva, oleate de etil, glicóis, por exemplo, propileno glicol e, se desejado, uma quantidade satisfatória de cloridrato de lidocaína.

15 As soluções para injeções intravenosas ou infusões podem conter, como um portador, água estéril ou preferivelmente elas podem estar na forma de soluções estéreis, aquosas, isotônicas, salinas ou elas podem conter propileno glicol como um portador. Infusões intravenosas  
20 podem ser conduzidas em um intervalo de tempo de cerca de 1 hora a aproximadamente 10 horas, seguindo de um regime semanal de tratamento por 1 a 6 ciclos semanais.

Os supositórios podem conter, junto com o composto ativo, um portador aceitável farmacologicamente, por  
25 exemplo, manteiga de cacau, glicol de polietileno, um

sorbitan de polioxietileno surfactantes de ester ácido graxo ou lecitina.

Composições farmacêuticas satisfatórias para uso na presente invenção incluem composições em que os  
5 ingredientes ativos estão presentes em uma quantidade efetiva, i.e., em uma quantidade efetiva para alcançar os benefícios profiláticos e/ou terapêuticos em um ser em tratamento. A quantidade efetiva atual para uma aplicação particular dependerá da condição ou condições do ser  
10 tratado, a condição do sujeito, a formulação, e a rota de administração, bem como outros fatores conhecidos aqueles versados na arte. A determinação de uma quantidade efetiva dos compostos da presente invenção está dentro das capacidades daqueles versados na arte, face ao revelado  
15 aqui, e será determinado usando técnicas de otimização rotineiras.

Em uso terapêutico, os compostos da invenção são administrados a um sujeito em níveis de dosagem de aproximadamente para cerca de  $30 \text{ mg/m}^2$   $3000 \text{ mg/m}^2$  de  
20 superfície do corpo por dia. Um nível de dosagem de cerca de  $100 \text{ mg/m}^2$  para  $1000 \text{ mg/m}^2$  constitui uma gama particularmente satisfatória. Para um adulto sujeito humano, uma dosagem de cerca de 50 mg a aproximadamente 5000 mg por dose, mais preferivelmente cerca de 150 mg a  
25 aproximadamente 1000 mg por dose, de 1 a 5 vezes

diariamente, pode ser usada como exempl, mas não se limitando a isto. Doses menores ou maiores do que aquelas reveladas aqui podem ser usadas, quando requerido. Porém, elas podem ser alteradas dependendo do número de variáveis, sem se limitar à atividade do composto usado, na condição a ser tratada, do modo de administração, do regime de tratamento, das exigências individuais do sujeito, da severidade da condição a ser tratada e das determinações médicas. As faixas anteriores são meramente sugestivas, enquanto que como o número de variáveis não é incomum em relação a um regime de tratamento individual que é grande e considerável nas excursões destes valores recomendados.

A quantidade efetiva para uso em humanos pode ser determinada em modelos animal. Por exemplo, uma dose para humanos pode ser formulada para circular no fígado ou em concentrações gastrointestinais e/ou tópicas, foi vista como efetiva em animais.

Em um terceiro aspecto a presente invenção se relaciona a um método de rastreamento para a identificação de compostos capazes de ligar o sítio ATP de uma proteína de quinase, compreendendo as etapas de:

prover uma mistura de reação que compreende a proteína de quinase, um derivado de indolinona que tem afinidade para o dito sítio ATP da proteína de quinase e é capaz de gerar um sinal fluorescente ao ligar o dito sítio

ATP, e diluições consecutivas do composto teste, comparando o sinal fluorescente gerado na ausência do composto teste com o sinal fluorescente gerado na presença de diferentes concentrações do composto teste, por meio de um nível  
5 decrescente de fluorescência que indica a habilidade do composto teste para deslocar o derivado de indolinona.

Em uma modalidade preferida do método de rastreamento, a proteína de quinase e o derivado de indolinona são pré-misturados.

10 Em outra modalidade preferida do método de rastreamento, a proteína de quinase e o composto teste são pré-misturados.

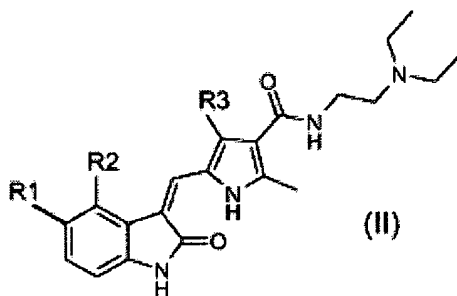
Em uma modalidade preferida adicional do método de rastreamento, proteína de quinase é um quinase da ABL.

15 Em uma modalidade mais preferida, a quinase da ABL é mutante T315I quinase da ABL.

O termo "proteína de quinase" engloba as proteínas nativas completas como também fragmentos desta, enquanto os fragmentos compreendem o sítio ATP da proteína de quinase.

20 O termo "sítio ATP" indica o local ATP é ligada dentro da proteína de quinase.

O derivado de indolinona é preferivelmente um composto da fórmula (II) abaixo:



em que R1 é hidrogênio ou metilamino-sulfonil ou benzil-sulfonil, R2 é hidrogênio ou metil, R3 é metil ou 4-clorofenil ou 2,4-difluorofenil.

5 Mais preferivelmente, o derivado de indolinona é um composto selecionado do grupo que consiste de:

Ácido 2,4-dimetil-5-[2-oxo-5-fenilmetanosulfonil-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-1H-pirrol-3-carboxílico (2-dietilamino-etil)-amida (que foi revelado no pedido de  
10 patente Internacional WO02/096361)

4-(4-clorofenil)-N-[2-(dietilamino)etil]-2-metil-5-((Z)-5{(metilamino)sulfonil}-2-oxo-1,2-dihidro-3H-indol-3-ilideno)metil)-1 H-pirrol-3-carboxamida;

N-[2-(dietilamino)etil]-4-(2,4-difluorofenil)-2-  
15 metil-5-((Z)-{5-[(metilamino)sulfonil]-2-oxo-1,2-dihidro-3H-indol-3-ilidenometil})-1H-pirrol-3-carboxamida;

4-(4-clorofenil)-N-[2-(dietilamino)etil]-2-metil-5-[(Z)-(4-metil-2-oxo-1,2-dihidro-3H-indol-3-ilideno)metil]-1H-pirrol-3-carboxamida.

20 Os derivados de indolinona foram selecionados para a sua capacidade de ligar o sítio ATP tanto ao tipo selvagem quanto às formas transformadas da ABL, para a afinidade do

teste para a proteína quinase, para a robustez do ensaio, e de acordo com dados publicados sobre os inibidores da ABL conhecidos (eg: Imatinibe).

O sinal de fluorescência pode ser medido, por exemplo, por um leitor de placa, tal como o leitor de placa Fusion  $\alpha$ -FP HT (Packard). A habilidade de deslocamento do composto teste está em correlação direta com a afinidade do composto para o sítio ATP da proteína de quinase. A Afinidade de ligação constante (KD) do composto teste pode ser determinada como explicado nos exemplos.

O ensaio da invenção é baseado no novo achado em que é observado um aumento significativo da intensidade de fluorescência ao ligar os derivado de indolinona a proteínas de quinase. Portanto, os grupos quimicamente ligados a um teste de afinidade são capazes de ligar a porção alvo provida para o sinal fluorescente. Porém, tais métodos sofrem desvantagens relacionadas à baixa afinidade pelo sítio da quinase que impede a possibilidade de ajustar os ensaios sensíveis. Uma aproximação alternativa que foi usada confia no teste de ligação imobilizado ou proteína de quinase com as limitações típicas de um ensaio da fase sólida (por exemplo, impedimento estérico e necessidade de lavagem).

A presente invenção supera estas desvantagens, tendo em vista que as indolinonas mostram uma afinidade

relativamente alta para quinase alvo e o sinal gerado na ligação é diretamente dependente na ligação permitindo construir um ensaio homogêneo.

Considerando que o presente ensaio de blindagem é por este meio exemplificado com a quinase da ABL, uma pessoa versada na técnica poderá realizar isto, sem experimentação indevida, também com outras proteínas de quinase, a proteína quinase fornecida contém um sítio ATP. De fato, os presentes inventores detectaram uma mudança no sinal de fluorescência quando o ensaio é realizado com o fator de crescimento como Insulina (desfosforilada e tridesfosforilada) o Receptor de insulina (desfosforilada e tridesfosforilada), c-Met, Aik, Chk1 e PDK1. É então esperado que possam ser empregadas proteínas quinases adicionais de modo adequado no ensaio da presente invenção.

Finalmente a presente invenção se relaciona ao uso do composto de fórmula (I) ou um sal farmaceuticamente aceitável deste, como definido acima, na fabricação de um medicamento para tratar uma doença mediada ABL T315I resistente ao inibidor BCR-ABL.

Com o objetivo de melhor ilustrar a presente invenção, sem impor qualquer limitação a esta, agora são dados os exemplos a seguir.

#### BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A figura 1 ilustra a atividade inibidora do composto

1 e Imatinibe na atividade da quinase do tipo selvagem ABL e domínio quinase mutante ABL T315I.

A atividade inibidora foi medida através da análise da quinase em gel na presença da concentração crescente do  
5 composto. A proteína básica de mielina foi usada como substrato.

A figura 2 é um immunoblotting que mostra a inibição de BCR-ABL em células leucêmicas K-562 tratadas com o composto 1 (linha 2) ou Imatinibe (linha 3).

10 A inibição da sinalização BCR-ABL foi analisada monitorada o estado de fosforilação dos alvos STAT5 ou CRKL. A linha 1 mostra as células K-562 não tratadas.

A figura 3 é um immunoblotting que mostra a inibição de tipo selvagem e mutante ABL T315I pelo composto 1 em  
15 células transfectadas HCT-116. As células de tumor coloretal HCT-116 foram transfectada com um tipo selvagem ABL (linha 1) ou um mutante ABL T315I expressão construída (linha 2). As células lisadas foram analisadas por immunoblotting que usa anticorpos contra proteína ABL total  
20 ( $\alpha$ -ABL) ou um anticorpo fosfo-específico que reconhece ABL quando é fosforilada na posição Y412 ( $\alpha$ -pY412-ABL). Uma comparação entre células não tratadas (-) e tratadas (+) mostra de células que o composto 1 é capaz de inibir tanto o tipo selvagem quanto o mutante ABL T315I.

## Exemplos

Nos exemplos a seguir, os números dos resíduos de aminoácido se referem ao número Genbank de acesso para a isoforma 1a da proteína ABL AAB60394

## 5 Exemplo 1:

Clonagem, expressão e purificação do domínio quinase mutante ABL recombinante.

O domínio quinase ABL (correspondendo aos resíduos 229-512) foi amplificados por PCR uma biblioteca de cDNA de testículos humano. Amplificação foi realizada usando o  
10 oligonucleotídeo no sentido direto:

5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTACTGGAAGTTCTGTTCCAGGG  
GCCCTCCCCCAACTACGACAAGTG-3'; [SEQ ID N°: 1] e o  
oligonucleotídeo no sentido reverso:

15 5'GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTTATTTCCTCCAGCTCCTTTTC  
CAC-3' [SEQ ID N°: 2]

Para propostas de clonagem, os oligonucleotídeos incluíram locais attB para obter um produto PCR attB-flanqueado satisfatório para clonagem usando a tecnologia  
20 Gateway® (Invitrogen). Além disso, para propostas de purificação, o primer no sentido direto incluiu uma divisão local PreScission® (Amersham Biosciences). O produto PCR resultante foi clonado no vetor de expressão baculovírus pVL1393 (Invitrogen) Gateway®-modificada. Para propostas de  
25 purificação e expressão, uma etiqueta GST foi adicionada ao

N-terminal para o domínio da quinase ABL.

A clonagem foi executada de acordo com os protocolos descritos no manual de Gateway®.

O mutante ABL T315I resistente ao Imatinibe foi gerado por mutagênese local-direcionado usando o kit mutagênese QuikChange® (Stratagene).

O oligonucleotídeo usado na reação de mutagênese foi: 5'-CCCGTTCTATATCATCATTGAGTTCATGACCTACG-3' [SEQ ID N°: 3].

Os baculovírus foram gerados através da cotransfecção células de inseto Sf9 com o vetor de expressão e o DNA usando o kit de transfecção BaculoGold® (Pharmlngen). Cobrenadantes virais foram recuperados após 5 dias e expostos a 3 rodadas de amplificação para aumentar titer virótico. As proteínas recombinantes foram produzidas para infectar a células de inseto High5 com densidade de  $1 \times 10^6$  células por ml com 3 ml sobrenadante virótico por bilhões de células. Depois de 48 horas de infecção, as células foram recuperadas, empelotadas e congeladas a  $-80^\circ\text{C}$ . Para purificação das proteínas recombinantes, as pelotas foram descongeladas, resuspensas no tampão lisado (Tris - HCl 50 mM, NaCl 150 mM, CHAPS 0,2%, DTT 20 mM, glicerol 10%) e lisada através de ultra-som. Os lisados foram clareados por centrifugação a 20000 g por 30 minutos e carregado em uma coluna de glutationa sefarose 4B® (Amersham Biosciences). Após extensa lavagem, as proteínas recombinantes foram

clivadas e eluidas através da incubação com protease PreScission®.

Exemplo 2:

A atividade dos compostos foi avaliada dentro de um  
5 ensaio quinase em gel que mede a fosforilação da proteína  
básica mielina pelo tipo selvagem recombinante e mutante  
ABL T315I do domínio quinase.

Os ensaios foram realizados em 20 µl de uma mistura  
de reação que contém 15 NM de enzima de recombinante, 10 µM  
10 de proteína básica mielina (Sigma-Aldrich) como substrato,  
10 mM Hepes pH 7,5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 15 nM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 4%  
DMSO, 3 nM ATP, 0,1 µCurie de γP<sup>32</sup>-ATP. O composto 1 foi  
testado e Imatinibe também foi testada em paralelo como  
referência. A concentração do inibidor varia de 10 NM a 10  
15 µM. Depois da pré-incubação da enzima e do substrato com o  
inibidor por 15 minutos a temperatura ambiente, o ATP foi  
adicionado e a reação foi conduzida por 30 minutos a 30°C e  
terminada com adição de gel carregando o tampão e fervendo  
por 5 minutos. As misturas de reação foram então carregadas  
20 em um 10% gel de poliacrilamida-SDS. Depois da separação,  
os géis foram secados e sinal de radioatividade foi  
revelado usado o sistema Phosphorimager (Dinâmica  
Molecular).

Como esperado, a imatinibe pode inibir a atividade da  
25 quinase do tipo selvagem do domínio da quinase ABL,

enquanto era completamente inativo no mutante T315I. De modo contrário, o composto testado foi ativado em ambos os tipos selvagem e mutante T315I com a mesma potência.

Exemplo 3:

5 O ajuste do ensaio de deslocamento dependente do local ATP e validação.

Um ensaio de deslocamento dependente do local ATP foi ajustado para a avaliação da afinidade quantitativa dos compostos testados.

10 O ensaio leva vantagem do aumento significativo na intensidade de fluorescência observada na ligação de certos derivados de indolinonas a proteínas de quinase.

Aqui abaixo, nós mostramos os resultados obtidos com dois derivados de indolinonas diferente, selecionados como testes de potencial na base da magnitude de aumento de fluorescência ao ligar a ABL.

3.1 Teste de Indolinona ácido 2,4-dimetil-5-[2-oxo-5-fenilmetanosulfonil-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-1H-pirrol-3-carboxílico (2-dietilamino-etil)-amida

20 Indolinona ácido 2,4-dimetil-5-[2-oxo-5-fenilmetanosulfonil-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-1H-pirrol-3-carboxílico (2-dietilamino-etil)-amida foi avaliado para sua habilidade para ligar domínio da quinase ABL do tipo selvagem e o mutante ABL T315I em um experimento de titulação. O desempenho do ensaio (fator Z) bem como o

25

deslocamento do teste por ATPyS e Imatinibe foram avaliados. Em todos os experimentos, o sinal de fluorescência foi medido usando o leitor de placa Fusion  $\alpha$ -FP HT (Packard). A análise dos dados foi realizada usando software Dynafit.

Particularmente, os dados de titulação foram ajustados para o seguintes equilíbrio: Enzima + teste  $\rightleftharpoons$  teste de enzima complexa, enquanto os dados de deslocamento foram ajustados para o seguinte equilíbrio: Enzima + teste  $\rightleftharpoons$  teste de enzima complexa, Enzima + Compsto  $\rightleftharpoons$  Composto de Enzima Complexo, por meio da ligação do teste e o composto na enzima são mutuamente exclusivos (mecanismo competitivo puro).

A experiência de titulação foi realizada como a seguir: 10 NM domínio quinase ABL (tipo selvagem ou mutante T3151), concentração de indolinona de 3  $\mu$ M para 0, com etapas de diluição 1:1.5 em 50 mM TrisHCl, pH 7,5, 150 mM NaCl<sub>2</sub>, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM Mn Cl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 1% DMSO, 3  $\mu$ M Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (tampão 1). Os resultados obtidos (mostrado na Tabela 1 abaixo) indicam que o teste é capaz de ligar todas as formas testadas do domínio da quinase ABL. O fator Z' ( $Z' = 1 - (3 * (SD_{\text{teste+proteína}} + SD_{\text{teste}}) / (\text{Mean}_{\text{teste+proteína}} + \text{Mean}_{\text{teste}}))$ ) foi determinado como a seguir: concentração do teste de saturação (0,15, 0,12 e 0,42  $\mu$ M para ABL selvagem desfosforilada (OP), tipo selvagem e T315I,

respectivamente) foi avaliado na presença (probe+protein) ou na ausência (teste) de 10 e 5 NM de proteína. Em todos os casos, os valores de Z foram maior que 0,8 que indicam que os ensaios foram robustos.

5 O ensaio foram validados usando ATPyS e Imatinibe em um ensaio de deslocamento como a seguir:

As diluições dos compostos de teste (etapa de diluição 1:2) foram primeiro preparadas em 7% DMSO e diluições adicionais no teste de tampão 1 para ter 1% de  
10 concentração DMSO final. ATPyS foi testado a 250  $\mu$ M como concentração mais alta, enquanto 10  $\mu$ M foi Imatinibe de concentração mais alta. As enzimas estavam presentes em uma concentração final de 10 NM. As concentrações dos testes finais foram 0,15, 0,12 e 0,42  $\mu$ M, respectivamente, para  
15 ABL tipo selvagem desfosforilada (OP), tipo selvagem T315I, respectivamente. A mistura da enzima e a sonda foram adicionados aos compostos previamente diluídos. Resultados (Tabela 1) indica que a sonda pode ser completamente deslocada pelo ATPyS de todas as sondas ABL construídas  
20 indicando que a indolinona se liga no sítio ATP. Em conformidade, a afinidade de ligação constante (KD) foi determinada pelo ajuste com o mecanismo competitivo puro. Os valores KD são a média de três experiências independentes.

25 Imatinibe, como esperado, mostrou uma afinidade mais

alta para a forma desfosforilada do que para a forma fosforilada da ABL, considerando que nenhum deslocamento foi observado no mutante ABL T315I.

5

TABELA 1

	Tipo selvagem ABL OP	Tipo selvagem ABL	ABL T315I
Teste de titulação, KD ( $\mu\text{M}$ )	$0,005 \pm 0,03$	$0,04 \pm 0,02$	$0,14 \pm 0,07$
ATP $\gamma$ S, KD' ( $\mu\text{M}$ )	$9,5 \pm 3,4$ (100% mostrado)	$9 \pm 1,9$ (100% mostrado)	$2 \pm 0,21$ (100% mostrado)
Imatinibe( $\mu\text{M}$ )	(100% mostrado)	$0,17 \pm 0,02$ (100% mostrado)	0% mostrado

Tomados juntos estes resultados mostram que o ensaio de deslocamento é dependente do local ATP e as afinidades medidas estão em linha com os dados publicados em Imatinibe (CARTER, T.A., et al. Inhibition of drug-resistant mutants of ABL, KIT, and EGF receptor kinases. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.. 2005, vol. 102, no.31 , p.1 101 1-1 1016. FABIAN, Miles A., et al. A small molecule-kinase interaction map for clinical kinase inhibitors . Nat. biotechnol 2005, vol.23, no.3, p.329-336. ) ATP site-  
 10 dependent displacement assay with recombinant ABL kinase domains.  
 15

O ensaio de deslocamento dependente do local ATP com domínios quinase ABL recombinante

A afinidade que liga o composto com o tipo selvagem

recombinante e mutante T315I domínio quinase ABL foram avaliados no ensaio de deslocamento. Os compostos da classe química pirrolopirazol foram testados, com Imatinibe incluído para comparação.

5 A Tabela 2 mostra a determinação afinidade de ligação constante (KD) para diferentes construções ABL. VX-680 é um inibidor de tirosinoquinase ATP competitivo de vértice que foi recentemente relatado por possuir in vitro habilidade de ligação para o mutante ABL T315I; O composto 1 é um  
10 composto exemplificativo da invenção.

TABELA 2

Composto	Tipo selvagem ABL OP KD ( $\mu$ M)	Tipo selvagem ABL KD ( $\mu$ M)	ABL T315I KD ( $\mu$ M)
VX680 (Vertex)	0,032 $\pm$ 0,007	0,031 $\pm$ 0,007	0,027 $\pm$ 0,001
Composto 1	0,008 $\pm$ 0,002	0,008 $\pm$ 0,001	0,001 $\pm$ 0,0001
Imatinibe	0,022 $\pm$ 0,003	0,017 $\pm$ 0,02	0% mostrado

Afinidade de ligação constante (KD) para o mutante ABL T315I foi também determinado por compostos exemplificativos adicionais da invenção.

15 Os resultados são informados na Tabela 3, onde o composto 2 é N-[5-(((2R)-2-metóxi-2-fenilacetil)-1,4,5,6-tetrahidro-pirrol[3,4-c]pirazol-3-il)-4-piperidin-1-il-benzamida; o composto 3 4-(4-etil-piperazin-1-il)-N-[5-

((R)-2-metóxi-2-fenil-acetil)-1,4,5,6-tetrahydro-pirrol  
 [3,4-c]pirazol-3-il]benzamida; o composto 4 é 4-(4-  
 ciclopropil-piperazin-1-il)-N-[5-((R)-2-metóxi-2- fenil-  
 acetil)1,4,5,6-tetrahydro-pirrol[3,4-c]pirazol-3-il]-  
 5 benzamida; composto 5 é 4-(4-isopropil-piperazin-1-il)-N-  
 [5-((R)-2-metóxi-2-fenil-acetil)-1,4,5,6-tetrahydro-  
 pirrol[3,4-c]pirazol-3-il]-benzamida.

TABELA 3

Composto	ABL T315I mutante KD ( $\mu\text{M}$ )
Composto 2	0,002 $\pm$ 0,0008
Composto 3	0,0017 $\pm$ 0,0006
Composto 4	0,007 $\pm$ 0,003
Composto 5	0,0024 $\pm$ 0,0007
Imatinibe	0% mostrado

O ensaio de deslocamento foi executado como descrito  
 anteriormente, com 3  $\mu\text{M}$  como a concentração mais alta  
 testada do inibidor com as etapas de diluição 1:1.5. Os  
 20 Resultados mostrados nas tabelas 2 e 3 indicam que todos os  
 compostos testadas eram ativos no mutante ABL T315I.

3.2 Teste indolinone N-[2-(dietilamino)etil]-4-(2,4-  
 difluorofenil)-2-metil-5-((Z)-{5-[(metilamino) sulfonil]-2-  
 oxo-1,2-dihidro-3H-indol-3-ilideno}metil)-1H-pirrol-3-  
 25 carboxamida

Indolinona N-[2-(dietilamino)etil]-4-(2,4-difluor-  
 fenil)-2-metil-5-((Z)-{5-[(metilamino) sulfonil]-2-oxo-1,2-  
 dihidro-3H-indol-3-ilideno}metil)-1H-pirrol-3-carboxamida  
 foi avaliada pela sua habilidade para ligar o tipo selvagem  
 5 do domínio de quinase ABL e o mutante ABL T315I em um  
 experimento de titulação, como descrito acima. As condições  
 aplicadas foram as mesmas com exceção da concentração de  
 teste de saturação (2, 3,3 e 0,2  $\mu\text{M}$  para ABL tipo selvagem  
 desfosforilada (OP), tipo selvagem e T315I,  
 10 respectivamente) e o teste de concentração final (2, 3,3 e  
 0,2  $\mu\text{M}$  para ABL tipo selvagem desfosforilada (OP), tipo  
 selvagem e T315I, respectivamente).

Também neste caso, os resultados (Tabela 4) indicam  
 que o teste pode ser completamente deslocado pelo ATPyS de  
 15 todos os testes ABL construídos indicando que a indolinona  
 se liga no sítio ATP. Imatinibe, como esperado, mostrou uma  
 afinidade mais alta para a forma desfosforilada do que para  
 a forma fosforilada da ABL, considerando que nenhum  
 deslocamento foi observado no mutante ABL T315I.

20

TABELA 4

	ABL OP tipo selvagem	ABL tipo selvagem	ABL T315I
Teste de titulação, KD ( $\mu\text{M}$ )	0,2 $\pm$ 0,1	0,33 $\pm$ 0,12	0,02 $\pm$ 0,008

ATP $\gamma$ S, KD' ( $\mu$ M)	6,6 $\pm$ 1,6 (100% mostrado)	4,8 $\pm$ 1 (100% mostrado)	2,61 $\pm$ 0,9 (100% mostrado)
Imatinibe( $\mu$ M)	0,021 $\pm$ 0,008 (100% mostrado)	0,17 $\pm$ 0,02 (100% mostrado)	0% mostrado

Tomados juntos estes resultados mostram que o ensaio de deslocamento é dependente do local ATP e as afinidades medidas estão em linha com os dados publicados em Imatinibe (CARTER, T.A., et al. *Ibid.*; FABIAN, Miles A., et al. *Ibid.*)

O ensaio de deslocamento dependente do local ATP com domínios quinase ABL recombinante

A afinidade que liga o composto com o tipo selvagem recombinante e mutante T315I domínio quinase ABL foram avaliados no ensaio de deslocamento como realtado em 3.1 e testando os mesmos compostos de pirrolopiraxole. A Tabela 5 mostra a afinidade de ligação constante (KD) para diferentes construções ABL.

TABELA 5

	ABL OP tipo selvagem	ABL tipo selvagem	ABL T315I
	KD ( $\mu$ M)	KD ( $\mu$ M)	KD ( $\mu$ M)
VX680 (Vertex)	0,058 $\pm$ 0,02	0,080 $\pm$ 0,01	0,043 $\pm$ 0,014
Composto 1	0,014 $\pm$ 0,003	0,018 $\pm$ 0,007	0,004 $\pm$ 0,001
Imatinibe	0,020 $\pm$ 0,006	0,017 $\pm$ 0,22	0% mostrado

Afinidade de ligação constante (KD) para mutante ABL T315I foi também determinado para compostos exemplificativos adicionais da invenção (os compostos 2 a 5 como definidos acima).

Os resultados são informados abaixo em Tabela 6.

TABELA 6

	ABL T315I mutante
	KD ( $\mu$ M)
Composto 2	0,0043 $\pm$ 0,0001
Composto 3	0,0028 $\pm$ 0,0001
Composto 4	0,0040 $\pm$ 0,0001
Composto 5	0,0026 $\pm$ 0,0005
Imatinibe	0% mostrado

15

O ensaio de deslocamento foi executado como descrito anteriormente, com 3  $\mu$ M como a concentração de inibidor mais alta testada. Os resultados mostraram nas tabelas 5 e 6 são as médias das três experiências independentes. Elas indicam que todos os compostos testados foram ativos no mutante ABL T315I.

Exemplo 4. Inibição da atividade ABL em células

Materiais e Métodos

Clonagem de polipeptídios da ABL

cDNA da ABL (correspondente aos resíduos 27-1130)

forma PCR amplificados de uma biblioteca de cDNA do testículo humano. A amplificação foi realizada usando o oligonucleotídeo no sentido direto:

5'GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTACTGGAAGTTCTGTTCCAG

5 GGGCCCGAAGCCCTTCAGCGGCCAGTAG-3' (SEQ ID NO:4) e o oligonucleotídeo no sentido reverso:

5'GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTTACCTCTGCACTATGT

CACTG-3' (SEQ ID NO:5)

Para propostas de clonagem, os oligonucleotídeos  
10 incluíram locais attB para obter um produto PCR attB-  
flanqueado satisfatório para clonagem usando a tecnologia  
Gateway® (Invitrogen). O produto do PCR resultante foi  
clonado no vetor de expressão mamífero pcDNA3.1/nV5 DEST  
(Invitrogen). A clonagem foi realizada adequadamente de  
15 acordo com os protocolos descritos no manual de Gateway®.

O mutante T315I resistente ao imatinibe foi gerado por mutagênese local dirigida usando QuikChange® o kit mutagênese (Stratagene).

O oligonucleotídeo usado na reação da mutagênese foi:

20 5'-CCCCGTTCTATATCATCATTGAGTTCATGACCTACG-3' (SEQ ID  
NO:6).

Immunoblotting

Immunoblotting foi realizado de acordo com métodos  
padrões. As células foram preparadas em 125 mM pH de Tris-  
25 HCl 6,8 e 2% SDS. As amostras foram submetidas ao ultra-som

e aquecido para 5 min a 95°C. 10 µg do extrato de proteína, como determinado por BCA™ Protein Assay (Pierce, Rockford, IL) foi carregado em SDS-PAGE.

O Kit de super sinal de quimioluminescência (Pierce, Rockford, o IL) foi usado para detecção. A análise de lmmunoblot foi realizada usando os seguintes anticorpos: anti-ABL (SIGMA, catalogue nº. A5844); anti-pY412-ABL (CELL SIGNALING, catalogue nº. 2865); anti-Stat-5 (CELL SIGNALING, catalogue nº. 9352); anti-pStat-5, anti-Crkl, anti p-Crkl, anti-Elf4e (BCR/ABL Activity Assay, CELL SIGNALING, catalogue no.7130)

#### Resultados:

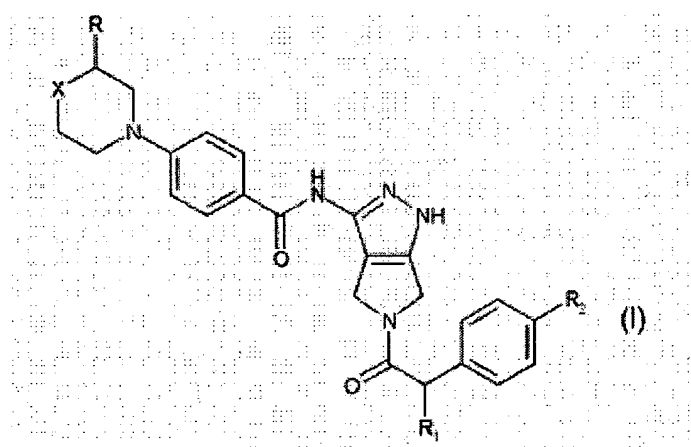
Para confirmar a atividade inibidora de um composto exemplificativo da invenção que expressa células de BCR-ABL de modo endógeno, o composto 1 foi testado em células leucêmicas K-562 que suportam o cromossomo Filadélfia relacionadas a translocação de BCR-ABL. As células forma tratadas durante uma hora com o composto 1 ou Imatinibe. As células foram coletadas e analisadas através de immunoblotting para inibição da auto-fosforilação ABL do resíduo da tirosina na posição 412 (Y412) que é localizada na alça de ativação de quinase da ABL. As proteínas de sinalização conhecidas como Stat-5 ou Crkl foram analisadas para os seus estados de fosforilação. O composto 1 e Imatinibe (em concetração clinicamente relevante), inibe a

fosforilação de Y412 e fosforilação dos mediadores de BCR-ABL Stat-5 e Crkl (Figura 2) confirmando o mecanismo esperado de ação, considerando que nenhum efeito foi visto em Src excluindo um efeito geral na fosforilação de  
5 proteína (dados não mostrados).

Para testar a atividade celular do Imatinibe e do composto 1 em células no mutante ABL T315I, as células de HCT-116 foram transfectada com tipo selvagem ou com a expressão mutante construída (veja Materiais e Métodos  
10 acima) e a atividade inibidora foi testada para Imatinibe e o composto 1 a 5  $\mu$ M. Como esperado Imatinibe mostrou atividade inibidora construída só no tipo selvagem ABL, considerando que o mutante ABL T315I construído era resistente. Em contraste, o composto 1 mostrou uma forte  
15 atividade inibidora para o tipo selvagem e o mutante ABL T315I (Figura 3).

## REIVINDICAÇÕES

1. Método para inibir uma atividade do inibidor resistente a tirosinoquinase BCR-ABL, CARACTERIZADO pelo fato de que compreende contactar um polipeptídeo inibidor resistente a tirosinoquinase BCR-ABL com uma quantidade efetiva do composto de fórmula (I)



em que R é hidrogênio ou metil,

10 R<sub>1</sub> é hidróxi ou um grupo alcóxi ou alquil C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> linear ou ramificado,

R<sub>2</sub> é um hidrogênio ou átomo de halogênio,

X é um grupo divalente selecionado de metileno (-CH<sub>2</sub>-) ou fluormetileno (-CHF-), ou um heteroátomo ou grupo heteroatômico selecionados de oxigênio (-O-) ou nitrogênio (-NR'-) onde R' é um átomo de hidrogênio, um grupo alquil C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> linear ou ramificado ou um grupo cicloalquil C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, ou um sal farmacologicamente aceitável deste.

2. Método, de acordo com, a reivindicação 1, 20 CARACTERIZADO pelo fato de que polipeptídeo inibidor resistente a tirosinoquinase BCR-ABL é uma tirosinoquinase

ABL do mutante T315I.

3. Método, de acordo com a reivindicação 2, CARACTERIZADO pelo fato de que o inibidor de BCR-ABL é Imatinibe.

5 4. Método para tratar uma doença mediada ABL T315I resistente ao inibidor BCR-ABL, CARACTERIZADO pelo fato de compreender administrar a um mamífero na necessidade do mesmo uma quantidade efetiva do composto de fórmula (I) como definido na reivindicação 1 ou um sal farmacologicamente  
10 aceitável deste.

5. Método, de acordo com a reivindicação 4, CARACTERIZADO pelo fato de que a doença mediada ABL T315I resistente ao inibidor BCR-ABL é a leucemia resistente ao inibidor BCR-ABL.

15 6. Método, de acordo com a reivindicação 5, CARACTERIZADO pelo fato de que a doença é leucemia mielogenosa crônica resistente ao inibidor BCR-ABL.

7. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 6, CARACTERIZADO pelo fato de que o  
20 inibidor de BCR-ABL é Imatinibe.

8. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, CARACTERIZADO pelo fato de que este é realizado com um composto da fórmula (I) em que R é hidrogênio, R<sub>1</sub> é metóxi, R<sub>2</sub> é hidrogênio e X é metileno (-CH<sub>2</sub>-) ou é um heteroátomo ou grupo heteroatômico  
25 selecionados de oxigênio (-O-) ou nitrogênio (-NR-) em que R' é um átomo de hidrogênio, ou um grupo alquil selecionado

de metil, etil, isopropil, ciclopropil ou tert-butil, ou um sal farmacêuticamente aceitável deste.

9. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 7, CARACTERIZADO pelo fato de que o composto da fórmula (I) é selecionado do grupo que consiste de:

N-{5-[(2R)-2-metóxi-2-feniletanoil]-1,4,5,6-tetrahidro pirrol[3,4-c]pirazol-3-il}-4-(4-metilpiperazin-1-il) benzamida;

10 N-{5-[(2R)-2-metóxi-2-feniletanoil]-1,4,5,6-tetrahidro pirrol[3,4-c]pirazol-3-il}-4-(4-etilpiperazin-1-il) benzamida;

15 N-{5-[(2R)-2-metóxi-2-feniletanoil]-1,4,5,6-tetrahidro pirrol[3,4-c]pirazol-3-il}-4-(4-isopropilpiperazin-1-il) benzamida;

N-{5-[(2R)-2-metóxi-2-feniletanoil]-1,4,5,6-tetrahidro pirrol[3,4-c]pirazol-3-il}-4-(4-ciclopropilpiperazin-1-il) benzamida;

20 N-{5-[(2R)-2-metóxi-2-feniletanoil]-1,4,5,6-tetrahidro pirrol[3,4-c]pirazol-3-il}-4-piperidin-1-ilbenzamida;

4-(4-fluoropiperidin-1-il)-N-{5-[(2R)-2-metóxi-2-feniletanoil]-1,4,5,6-tetrahidropirrol[3,4-c]pirazol-3-il} benzamida

25 N-{5-[(2R)-2-metóxi-2-feniletanoil]-1,4,5,6-tetrahidro pirrol[3,4-c]pirazol-3-il}-4-morfolin-4-ilbenzamida;

N-{5-[(2R)-2-metil-2-feniletanoil]-1,4,5,6-tetrahidro pirrol[3,4-c]pirazol-3-il}-4-(4-metilpiperazin-1-il)

benzamida;

N-{5-[(2R)-2-metil-2-feniletanoil]-1,4,5,6-tetrahidro  
pirrol[3,4-c]pirazol-3-il}-4-(4-etilpiperazin-1-il)

benzamida;

5 N-{5-[(2R)-2-fenilpropanoil]-1,4,5,6-tetrahidro  
pirrol[3,4-c]pirazol-3-il}-4-piperidin-1-ilbenzamida;

4-(4-fluoropiperidin-1-il)-N-{5-[(2R)-2-fenilpropano  
il]-1,4,5,6-tetrahidropirrol[3,4-c]pirazol-3-il}benzamida;

4-morfolin-4-il-N-{5-[(2R)-2-fenilpropanoil]-1,4,5,6-  
10 tetrahidropirrol[3,4-c]pirazol-3-il}benzamida.

10. Método, de acordo com a reivindicação 8,  
CARACTERIZADO pelo fato de que o composto da fórmula (I) é  
selecionado do grupo que consiste de:

N-{5-[(2R)-2-metóxi-2-feniletanoil]-1,4,5,6-tetrahidro  
15 pirrol[3,4-c]pirazol-3-il}-4-(4-metilpiperazin-1-il)  
benzamida;

N-{5-[(2R)-2-metóxi-2-feniletanoil]-1,4,5,6-tetrahidro  
pirrol[3,4-c]pirazol-3-il}-4-(4-etilpiperazin-1-il)  
benzamida;

20 N-{5-[(2R)-2-metóxi-2-feniletanoil]-1,4,5,6-tetrahidro  
pirrol[3,4-c]pirazol-3-il}-4-(4-isopropilpiperazin-1-il)  
benzamida;

N-{5-[(2R)-2-metóxi-2-feniletanoil]-1,4,5,6-tetrahidro  
pirrol[3,4-c]pirazol-3-il}-4-(4-ciclopropilpiperazin-1-il)  
25 benzamida;

11. Método, de acordo com a reivindicação 10,  
CARACTERIZADO pelo fato de que o composto da fórmula (I) é

N-{5-[(2R)-2-metóxi-2-feniletanoil]-1,4,5,6-tetrahidro  
pirrol[3,4-c]pirazol-3-il}-4-(4-metilpiperazin-1-il)  
benzamida.

12. Método de rastreamento para a identificar os  
5 compostos capazes de ligar o sítio ATP de uma proteína de  
quinase, CARACTERIZADO por compreender as etapas de:

prover uma mistura de reação que compreende a proteína  
de quinase, um derivado de indolinona que tem afinidade para  
o sítio ATP da dita proteína quinase e que é capaz de gerar  
10 um sinal fluorescente ao ligar o dito sítio ATP, e diluir  
consecutivamente o composto teste, comparar o sinal  
fluorescente gerado na ausência do composto teste com o  
sinal fluorescente gerado na presença de diferentes  
concentrações do composto teste, através do qual um nível  
15 decrescente de fluorescência que indica a habilidade do  
composto teste desloca o derivado de indolinona.

13. Método, de acordo com a reivindicação 12,  
CARACTERIZADO pelo fato de que a proteína de quinase e o  
derivado de indolinona são pré-misturados.

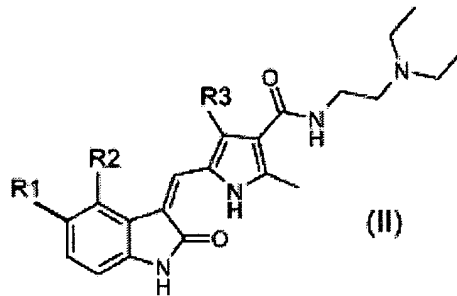
20 14. Método, de acordo com a reivindicação 12,  
CARACTERIZADO pelo fato de que a proteína de quinase e o  
composto teste são pré-misturados.

15. Método, de acordo com qualquer uma das  
reivindicações de 12 a 14, CARACTERIZADO pelo fato de que a  
25 proteína de quinase é um quinase da ABL.

16. Método, de acordo com a reivindicação 15,  
CARACTERIZADO pelo fato de que a quinase da ABL é mutante

T315I da quinase da ABL.

17. Método de acordo com qualquer um das reivindicações de 12 a 16, CARACTERIZADO pelo fato de que a indolinona é um composto da fórmula (II)



5

em que R1 é hidrogênio ou metilamino-sulfonil ou benzil-sulfonil, R2 é hidrogênio ou metil, R3 é metil ou 4-clorofenil ou 2,4-difluorofenil.

18. Método, de acordo com a reivindicação 17, CARACTERIZADO pelo fato de que a indolinona é selecionada do grupo que consiste de:

ácido 2,4-dimetil-5-[2-oxo-5-fenilmetanosulfonil-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-1H-pirrol-3-carboxílico (2-dietilamino-etil)-amida;

15 4-(4-clorofenil)-N-[2-(dietilamino)etil]-2-metil-5-((Z)-5{(metilamino)sulfonil}-2-oxo-1,2-dihidro-3H-indol-3-ilideno)metil)-1 H-pirrol-3-carboxamida;

N-[2-(dietilamino)etil]-4-(2,4-difluorofenil)-2-metil-5-((Z)-{5-[(metilamino)sulfonil]-2-oxo-1,2-dihidro-3H-indol-3-ilidenometil}-1H-pirrol-3-carboxamida;

20 4-(4-clorofenil)-N-[2-(dietilamino)etil]-2-metil-5-[(Z)-(4-metil-2-oxo-1,2-dihidro-3H-indol-3-ilideno)metil]-1H-pirrol-3-carboxamida.

19. Uso do composto de fórmula (I) ou um sal farmacologicamente aceitável deste, como definido nas reivindicações 1 ou 4, CARACTERIZADO pelo fato de ser usado na fabricação de um medicamento para tratar uma doença mediada ABL T315I resistente ao inibidor de BCR-ABL.

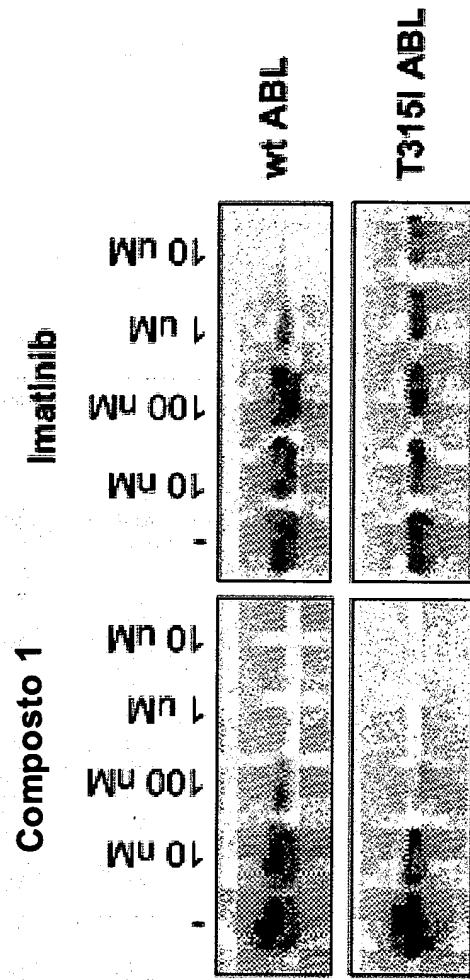


Figura 1

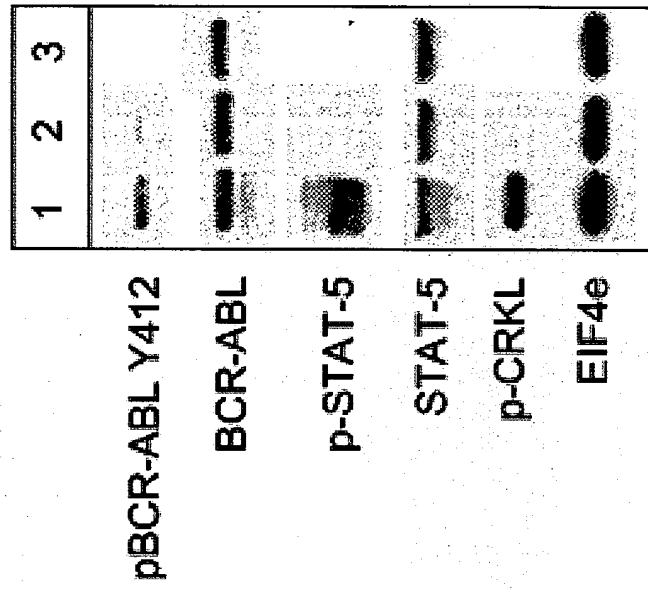


Figura 2

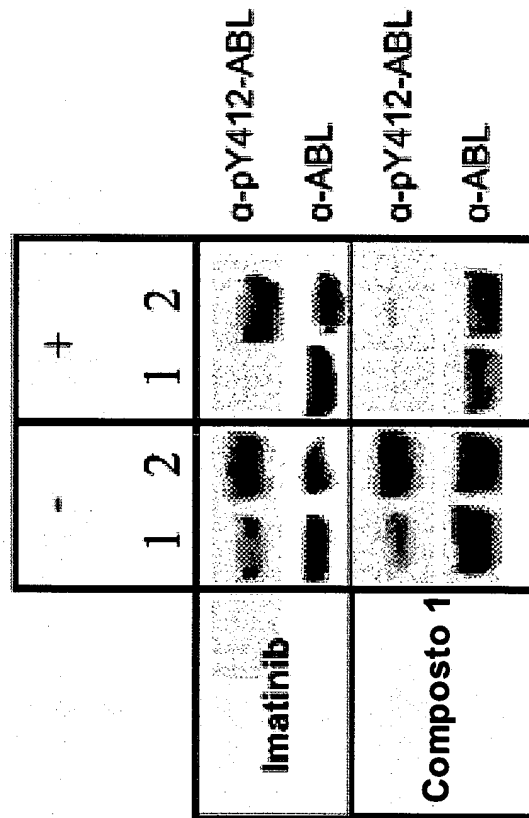


Figura 3

**RESUMO****USO DE UM INIBIDOR DE QUINASE PARA O TRATAMENTO DE TUMORES RESISTENTES PARTICULARES**

A presente invenção provê compostos de baixo peso molecular, nomeadamente, tetrahidropirrol[3,4-c]pirazoles, mostrando alta afinidade para uma sítio ATP da tirosinoquinase ABL. Estes compostos são, por conseguinte, inibidores de tirosinoquinase competitivos ATP que também exibem uma potência inibidora significativa, e em particular, para o inibidor resistente aos mutantes de BCR-ABL da ABL T315I. Os compostos da invenção encontram aplicação no tratamento das doenças mediadas ABL inibidor resistente BCR-ABL, tal como leucemia mielogenosa crônica resistente a Imatinibe. Além disso, a invenção provê um método de rastreamento para a identificação de compostos capazes de ligar o sítio ATP de uma proteína de quinase, particularmente da quinase ABL do mutante T315I.